

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Tereza Kořánová

Význam povrchové exprese proteinu Tim-3 na buňkách akutní myeloidní leukémie
Significance of Tim-3 protein expression on the surface of acute myeloid leukemia cells

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Kateřina Kuželová, Ph.D.

Praha 2020

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především své školitelce RNDr. Kateřině Kuželové, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícný přístup při vedení mé bakalářské práce. Dále děkuji Mgr. Adamu Obrovi, Ph.D. za rady ohledně formální stránky práce a své rodině za podporu během celého studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 31. 5. 2020

Tereza Kořánová

Abstrakt

Akutní myeloidní leukémie (AML) je nádorové onemocnění krvetvorby, charakteristické produkcí nefunkčních prekursorů myeloidní buněčné řady. Mutace maligním buňkám poskytují schopnost proliferovat nezávisle na růstových faktorech a odolnost vůči indukci buněčné smrti. Součástí maligní transformace bývá také schopnost uniknout zásahu imunitního systému. T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3 (Tim-3) byl původně objeven na povrchu imunitních buněk, kde působí jako inhibitor jejich aktivity. Později byla zjištěna přítomnost Tim-3 také na leukemických buňkách, kde zatím jeho funkce není detailně popsána. Po vazbě galektinu-9 (Gal-9) působí Tim-3 na AML blastech jako aktivační receptor. Signalizace od komplexu Tim-3/Gal-9 vede ke stimulaci NF- κ B, β -cateninu, HIF-1, PKC a mTOR drah, které v jisté míře suplují funkci růstového faktoru. Podporují neustálou obnovu leukemických buněk, poskytují stimulační signály a pozitivní zpětnou vazbou dále zvyšují i produkci a sekreci Tim-3 a Gal-9. Důležitou funkcí Tim-3 je i transport a lokalizace Gal-9, který interakcí s Tim-3 na povrchu T lymfocytů blokuje jejich aktivaci, znemožňuje tvorbu imunologické synapse a výkon efektorových funkcí, podporuje vyčerpaný stav a dokonce indukuje apoptózu. U NK buněk Gal-9 tlumí imunoaktivační geny a inhibuje cytotoxicitu. Leukemické buňky také produkují solubilní formu Tim-3, která po vazbě na příslušné ligandy na povrchu T buněk snižuje produkci jejich hlavního růstového faktoru, cytokinu IL-2. Dráha Tim-3/Gal-9 se tak jeví jako možný cíl pro imunoterapii AML, avšak pro využití v klinické praxi je potřeba dalšího výzkumu.

Klíčová slova

akutní myeloidní leukémie, Tim-3, galektin-9, imunoterapie

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is a cancer disorder of hematopoiesis, characterised by production of dysfunctional progenitor cells of myeloid cell lineage. Mutations provide malignant cells with the ability to proliferate independently of growth factors and to resist to cell death induction. In addition, transformed cells are often capable of escaping the immune system. T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3 (Tim-3) was originally discovered on the surface of immune cells, where it acts as an inhibitory receptor. Later, Tim-3 was also found on leukemia cells, but its function on this cell type is much less clear. Upon ligation with galectin-9 (Gal-9), Tim-3 acts on AML blasts as an activating receptor. The Tim-3/Gal-9 complex signalization stimulates NF- κ B, β -catenin, HIF-1, PKC and mTOR pathways, which substitute to some extent the function of growth factors. They support continuous regeneration of leukemic cells, provide stimulatory signals, and further increase the production and secretion of Tim-3 and Gal-9 in a positive feedback loop. An important function of Tim-3 is the transport and localization of Gal-9, which blocks the activation of T lymphocytes by interacting with Tim-3 on their surface, inhibits formation of immunological synapse and execution of effector functions, supports exhausted state, and even induces apoptosis. Gal-9 suppresses immunoactivatory genes and inhibits cytotoxicity in NK cells. Leukemic cells also produce a soluble form of Tim-3, which lowers the production of the proliferation stimulating cytokine IL-2 after binding to respective ligands on the surface of T cells. The Tim-3/Gal-9 pathway thus appears as a promising target for immunotherapy of AML, however further research is required for possible use in clinical practice.

Key words

acute myeloid leukemia, Tim-3, galectin-9, immunotherapy

Obsah

Seznam zkratk	5
1. Úvod	6
2. Akutní myeloidní leukémie	7
2.1. Klasifikace	8
2.2. Léčba	9
3. Tim-3	11
3.1. Struktura	11
3.2. Galectin-9 jako ligand Tim-3	12
3.3. Solubilní forma	12
3.4. Exprese na T lymfocytech	13
3.4.1. Interakce s Gal-9	14
3.4.2. Vyčerpání T lymfocytů	14
3.5. Exprese na NK buňkách	17
4. Tim-3 a AML	18
4.1. Tim-3 jako marker leukemických kmenových buněk	18
4.2. Exprese Tim-3 na leukemických blastech	18
4.3. Autokrinní smyčka Tim-3/Gal-9	19
4.4. Vzájemné ovlivnění exprese Tim-3 a Gal-9 v buňkách AML	21
4.5. Význam dráhy Tim-3/Gal-9 v modulaci imunitního systému	23
4.5.1. Význam dráhy v modulaci T lymfocytů	23
4.5.2. Význam dráhy v modulaci NK buněk	24
4.6. Shrnutí možných následků exprese Tim-3 na AML buňkách	25
5. Klinický význam exprese Tim-3 na povrchu buněk AML	26
5.1. Využití Tim-3 jako selektivního terapeutického cíle	26
5.2. Význam v diagnostice	27
5.3. Kombinační terapie zaměřená na více znaků AML	28
6. Závěr	29
Seznam použité literatury	30

Seznam zkratek

ADAM ... A disintegrin and metalloprotease

AML ... akutní myeloidní leukémie

Bat3 ... HLA-B-associated transcript 3

CAR ... chimerický antigenní receptor

CRD ... carbon recognition domain

ELN ... European LeukemiaNet

FAB ... French-American-British

fsTim-3 ... fúzní solubilní Tim-3

Gal-9 ... galektin-9

HIF-1 ... hypoxia inducible factor 1

HKB ... hematopoetické kmenové buňky

IFN- γ ... interferon γ

IL-2 ... interleukin 2

Lck ... lymphocyte-specific tyrosine kinase

LKB ... leukemické kmenové buňky

MDS ... myelodysplastický syndrom

MHC ... major histocompatibility complex

mTOR ... mammalian target of rapamycin

NF- κ B ... nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NK ... natural killer

PD-1 ... programmed cell death protein 1

PKC ... proteinová kináza C

PMA ... phorbol 12-myristát-13-acetát

SCF ... stem cell factor

sTim-3 ... solubilní Tim-3

Tim-3 ... T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3

Tim-3L ... ligand Tim-3

TNF- α ... tumor necrosis factor α

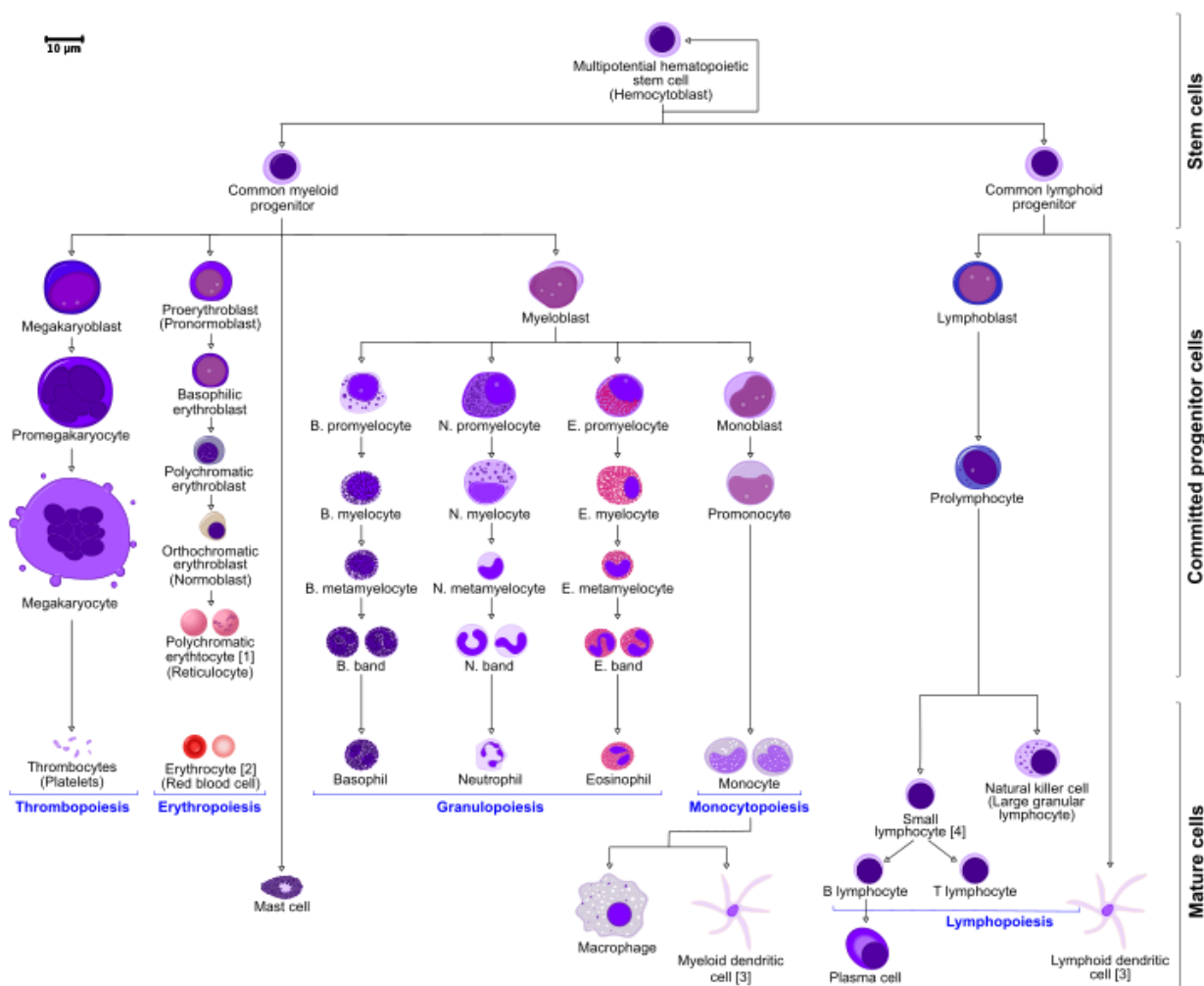
1. Úvod

Imunitní systém běžně rozpoznává a ničí nádorové buňky v lidském těle. Rakovina se i přesto může rozvinout díky různým možnostem imunosuprese. Inhibiční mechanismy, které umožňují únik před imunitním dohledem, jsou běžně využívány zdravými buňkami, které si tak zajišťují ochranu před autoreaktivními klony imunitních buněk. Maligní buňky přežívají, protože na ně imunitní systém dostatečně účinně nezareaguje. Navození takové tolerance může spočívat například ve znemožnění aktivace T lymfocytů. Tyto buňky totiž na svém povrchu exprimují inhibiční receptory, které fungují jako pojistka proti rozvinutí imunitní reakce vůči zdravým buňkám, které mají příslušné ligandy pro tyto inhibiční receptory. (Andersen 2014)

Jedním z takových regulačních receptorů je i Tim-3. (Monney, Sabatos et al. 2002) Na různých buňkách však zprostředkovává odlišnou signalizaci. V této práci bych proto chtěla shrnout nejpodstatnější informace o vlivu Tim-3 na imunitní systém v souvislosti s akutní myeloidní leukémií (AML) a dále se hlavně zaměřit na význam exprese Tim-3 přímo na nádorových buňkách AML. Cílem je objasnit především vliv na přežívání leukemických buněk a možný mechanismus úniku před imunitním systémem. V závěru práce bych chtěla nastínit možné využití těchto jevů v klinické praxi. Imunoterapie totiž otevírá další možnosti v léčbě pacientů s AML, především ve snaze zefektivnit léčbu a zároveň snížit její nežádoucí účinky.

2. Akutní myeloidní leukémie

Zdravé myeloidní a lymfoidní buňky jsou odvozeny od malé skupinky pluripotentních hematopoetických kmenových buněk (HKB) kostní dřeně, které mají zachovanou neustálou obnovu a mohou dát vznik všem krevním elementům. Z dělicích se kmenových buněk se totiž postupně oddělují a diferencují multipotentní progenitorové buňky a blasty, předchůdci koncových efektorových buněk. Blasty mají v určité míře zachovanou možnost obnovy, ale během dozrávání ji ztrácejí. (Griffin, Löwenberg 1986) (Obr. 1)



Obr. 1: Schéma hematopoézy. Pluripotentní kmenové buňky kostní dřeně se diferencují na dva základní multipotentní progenitory, které oddělují lymfoidní a myeloidní linii krevních buněk. Myeloidní prekursory v kostní dřeni dále postupně dozrávají, zralé efektorové buňky jsou pak vyplavovány do krve nebo migrují do tkání. (Převzato od Rad (2006))

Průběh krvetvorby je u AML narušený maligní transformací kmenové nebo myeloidní progenitorové buňky. Během onemocnění se pak v kostní dřeni a později i v periferní krvi akumulují nezralé myeloidní blasty, které nedokážou dozrát do výsledné podoby granulocytů, monocytů, erytrocytů či megakaryocytů a plnit své efektorové funkce. Navíc je potlačena zdravá hematopoéza, buď fyzickým vytlačením HKB leukemickými buňkami nebo produkcí inhibičních faktorů. Pro plnou transformaci zdravých buněk v leukemické je zpravidla potřeba souběhu více mutací. Při počáteční změně se buňky dostávají do tzv. preleukemického stavu a až po nahromadění dalších genetických odchylek vzniká leukemický stav se všemi svými patologickými důsledky. Mutace v leukemických buňkách mohou vznikat v mnoha bodech hematopoézy (počínaje u HKB, konče v pozdních fázích zrání) a to zcela nesynchronizovaně – v preleukemickém stavu se u každé transformované buňky může vytvořit široká škála odlišných změn, dávající vzniknout mnoha klonům leukemických kmenových buněk (LKB). U jednotlivých pacientů se tak úroveň a směr diferenciace blastů vzájemně liší, v heterogenní populaci leukemických buněk pak většinou převažuje jeden klon s nejvýhodnějšími (nejagresivnějšími) vlastnostmi. Analýzou povrchových markerů bylo zjištěno, že AML blasty mohou vykazovat fenotyp progenitorů granulocytů, erytrocytů, monocytů a megakaryocytů. (Griffin, Löwenberg 1986)

2.1. Klasifikace

Vzhledem k heterogenitě onemocnění existuje několik systémů klasifikací. Nejstarší, přesto stále používaná, je ze 70. let. Byla vytvořena hematolog z Francie, Ameriky a Velké Británie, odtud její název FAB (French-American-British). FAB klasifikace se opírá zejména o morfologické znaky blastů, imunofenotypizační a cytochemické metody a popisuje celkem osm subtypů AML na základě směru diferenciace blastů a jejich stupně vyzrání (v závorkách je uvedeno procentuální zastoupení jednotlivých subtypů) (Löwenberg, Downing et al. 1999)

M0 (3 %) – akutní myeloblastická leukémie s minimální myeloidní diferenciací

M1 (15-20 %) – akutní myeloblastická leukémie bez vyzrání myeloblastů

M2 (25-30 %) – akutní myeloblastická leukémie s vyzráním myeloblastů

M3 (5-10 %) – akutní promyelocytární leukémie (prekurzory granulocytů)

M4 (20 %) – akutní myelomonocytární leukémie

M5 (2-9 %) – akutní monocytární leukémie

M6 (3-5 %) – akutní erytroleukémie

M7 (3-12 %) – akutní megakaryocytoblastická leukémie

European LeukemiaNet (ELN) klasifikace, vytvořená v roce 2010, aktualizovaná 2017, je využívána lékaři v diagnostice. Klasifikace se opírá nejen o morfologické znaky jako FAB klasifikace, ale i o genetické změny a prognostické faktory. (Döhner, Estey et al. 2017) Je tedy celkově více komplexní a přesnější, ale protože není pro tuto práci relevantní, nebudu ji zde uvádět.

AML je také možné rozdělit čistě na základě okolností vzniku do tří skupin: 1) sekundární AML vyvinutá z předchozích onemocnění, obvykle z myelodysplastického syndromu (MDS) či myeloproliferativního onemocnění, 2) AML, která se rozvinula na základě předešlé radio- nebo chemoterapie a 3) *de novo* AML, nově vzniklá, bez předchozích poruch. (Saultz, Garzon 2016)

2.2. Léčba

Cílem první fáze léčby AML je dosažení kompletní remise – stavu, kdy vymizí příznaky onemocnění, respektive když je v kostní dřeni přítomno méně než 5 % blastů. (Saultz, Garzon 2016) Po diagnostikování AML je provedeno hodnocení, zda je pacient způsobilý pro intenzivní indukční chemoterapii, jejímž hlavním cílem je agresivně eliminovat leukemické buňky. Nezpůsobilý může být pacient například v případě vysokého věku, ve kterém je časté nahromadění více nežádoucích cytogenetických abnormalit nebo klinicky významných komorbidit. U takových pacientů je menší pravděpodobnost standardního účinku indukční chemoterapie. Kompletní odpovědi na indukční chemoterapii je dosaženo u 60 až 80 % dospělých pacientů ve věku 60 let a mladších. U starších pacientů se uspokojivé výsledky dostavují méně často – ve 40 až 60 % případů. (Döhner, Weisdorf et al. 2015)

Pokud je dosaženo remise, je také velmi důležitá následující terapie, která udržuje pod kontrolou nebo zcela eliminuje minimální reziduální nemoc – malé množství buněk nádoru přetrvávajících v organismu po úspěšné léčbě. Může tak zabránit případnému relapsu (navrácení onemocnění). Jsou dvě základní strategie následné léčby, kdy pacient podstupuje konvenční chemoterapii ve 2 až 4 cyklech nebo transplantaci hematopoetických buněk.

V mnoha případech jsou aplikovány obě metody. Transplantát může být dvojího druhu – allogenní (od dárce) nebo autologní (pacientovy vlastní zdravé buňky odebrané před chemoterapií). Ve většině případů se jedná o allogenní transplantaci, u autologní ani nebyly potvrzeny významnější pozitivní účinky. Transplantace může velmi přispět k potlačení leukémie díky reakci štěpu proti leukémii. Ta je způsobena přítomnými zdravými dárčovskými T lymfocyty a NK buňkami. Na druhou stranu proces transplantace kostní dřeně může přinášet i mnoho komplikací, například může štěp ve větší míře reagovat i na další tělní buňky (reakce štěpu proti hostiteli) a riskantní jsou i virové infekce v důsledku navození imunosuprese před podáním štěpu. (Döhner, Weisdorf et al. 2015)

Výsledky léčby závisí na mnoha okolnostech – typu AML, cytogenetických změnách (chromozomové přestavby a modifikace) a molekulárních abnormalitách (například mutace ve FLT3, NPM1, DNMT3A), předešlých poruchách, věku a celkové kondici pacienta, které určují prognostické zatížení. Neúspěšná léčba vede k relapsu a pokud se tak stane, míra přežití je velmi nízká. Pouze malá část pacientů totiž dosáhne úspěšné druhé remise. AML se může znovu rozvinout expanzí většinových nebo menšinových buněčných klonů nebo dokonce ze zcela nově mutovaných buněk. (Saultz, Garzon 2016) Výjimku z obecně nepříznivé prognózy tvoří pacienti, kteří podléhají relapsu po více než roce od dosažení remise. (Döhner, Weisdorf et al. 2015)

V průběhu let se intenzivnímu výzkumu AML věnovalo mnoho času, přesto terapie zůstává více méně stále stejná. Nové postupy se snaží cílit na různé buněčné signální dráhy, epigenetickou regulaci DNA a chromatinu nebo na antigenní proteiny na povrchu leukemických buněk, na které je možno zaměřit protilátkovou terapii. Jako slibná se jeví i konstrukce T lymfocytů s chimérickými antigenními receptory (CAR T buňky), které by byly schopné specificky reagovat na antigeny leukemických buněk a likvidovat je. Imunoterapie tak především spoléhá na podporu imunitního systému, který je potlačen. Přesto, že byl učiněn veliký pokrok v porozumění molekulárním drahám a okolnostem vzniku patogeneze AML, nebylo zatím možné tyto poznatky převést do klinické praxe. Nové postupy jistě mohou přinést prospěch léčeným pacientům, pokud budou prováděny společně s chemoterapií či transplantací, mohou zvýšit jejich účinnost a snížit vedlejší účinky. (Döhner, Weisdorf et al. 2015)

3. Tim-3

T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3 (Tim-3) je transmembránový receptor typu I, původně popsáný na diferencovaných cytotoxických T lymfocytech a pomocných T lymfocytech. Protein byl objeven v roce 2002 v rámci pokusu o identifikaci specifických povrchových markerů pro odlišení subpopulací pomocných T buněk, Th1 a Th2. Tim-3 byl detekován na populaci Th1 buněk, které jsou typické produkcí IFN- γ (interferon γ), IL-2 (interleukin 2) a TNF- α (tumor necrosis factor α). Tyto cytokiny aktivují imunitní systém v boji proti virům či bakteriím, které infikují tělní buňky. Th1 lymfocyty jsou dále zodpovědné za vznik imunopatologické reakce pozdního typu a orgánově specifických autoimunitních reakcí. (Monney, Sabatos et al. 2002) Později byla exprese Tim-3 potvrzena i na jiných buněčných typech: na natural killer (NK) buňkách (Gleason, Lenvik et al. 2012), dendritických buňkách, monocytech a makrofázích. (Anderson, Anderson et al. 2007)

Proteinová rodina Tim se společně nachází na pátém chromozomu v úseku 5q33.2, u myši na chromozomu 11. U lidí zahrnuje 3 členy: Tim-1, Tim-3 a Tim-4. Tim-1 je exprimován na zralých Th2 lymfocytech, kde posiluje jejich aktivaci. Tim-4 je exprimován na antigen prezentujících buňkách a je jedním z ligandů pro Tim-1. (Mariat, Sánchez-Fueyo et al. 2005)

3.1. Struktura

Celodélkový lidský Tim-3 sestává z 302 aminokyselin. Tvoří dvě extracelulární domény, variabilní imunoglobulinovou a mucinovou, na kterých se nacházejí místa pro čtyři N-glykosylace a pět O-glykosylací, které jsou důležité pro vazbu ligandů – zejména galektinu-9 (viz dále). Následuje transmembránová doména a intracelulární koncová doména, na které se nachází šest vysoce konzervovaných tyrosinů tvořících tyrosinový fosforylační motiv zprostředkovávající další buněčnou signalizaci. (Monney, Sabatos et al. 2002)

V imunoglobulinové variabilní doméně se nachází šest cysteinů; dva z nich tvoří typický disulfidický můstek mezi vlákny domény, další čtyři se spojují do dvou nekanonických disulfidických můstků, které přibližují jednotlivé smyčky v doméně. Tvoří tak specifický povrch ve formě žlábků, který je jedinečný mezi všemi ostatními proteiny s imunoglobulinovou doménou, protože u ostatních proteinů jsou tyto smyčky vždy orientované od sebe, na opačných stranách domény. Tento strukturní motiv je společný pro všechny členy rodiny Tim. (Cao, Zang et al. 2007)

3.2. Galectin-9 jako ligand Tim-3

Jako jeden z ligandů Tim-3 byl identifikován galektin-9 (Gal-9). (Zhu, Anderson et al. 2005) Galektiny jinak také nazývané lektiny typu S, se specificky vážou na cukerné zbytky, zejména na β -galaktosidy, volně se vyskytující nebo vázané v podobě glykoproteinů či glykolipidů. Přestože Gal-9 nemá transmembránovou doménu ani signalizační sekvenci potřebnou k translokaci, byl identifikován na povrchu buněk. (Wada, Kanwar 1997) Lokalizace na membráně je totiž umožněna interakcí s jinými proteiny. (Chabot, Kashio et al. 2002) Hlavní části Gal-9 jsou dvě domény rozeznávající uhlovodíky (carbohydrate recognition domain, CRD) spojené krátkým peptidem. Těmito doménami se Gal-9 váže k β -galaktosidu na glykosylovaných řetězcích proteinů (u Tim-3 na imunoglobulinové a mucinové doméně). Sekvenční podobnost mezi N-terminální a C-terminální CRD je 35 %, domény mají tudíž odlišné afinity pro oligosacharidy a široké signalizační možnosti v závislosti na interakcích. Obě však mohou být zapojeny do vazby s Tim-3. (Nagae, Nishi et al. 2006)

3.3. Solubilní forma

Solubilní forma Tim-3 je sestříhovou variantou celodélkového membránového proteinu. Transkript pro solubilní formu obsahuje pouze signální sekvenci, imunoglobulinovou doménu a intracelulární doménu spojené dohromady. Vyštěpeny jsou exony obsahující mucinovou a transmembránovou doménu. Tato sestříhová varianta existuje pouze u myši, ne u lidí. (Sabatos, Chakravarti et al. 2003)

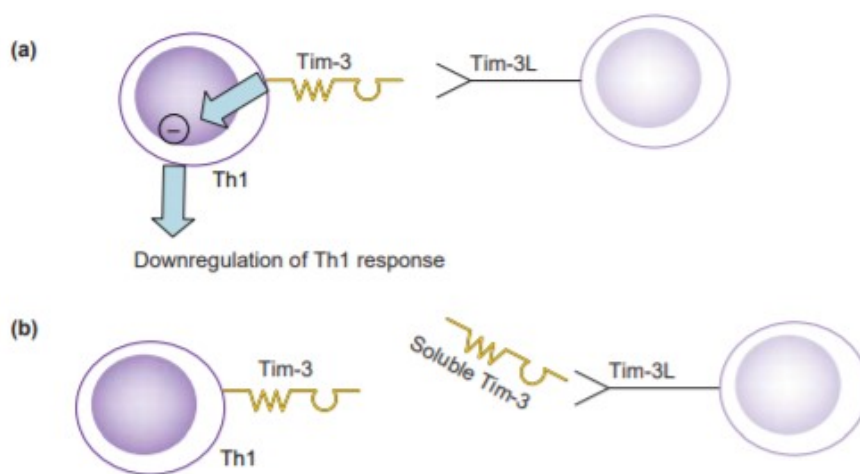
Díky proteázám je však možné odštípnout Tim-3 z buněčného povrchu a vytvořit tak jeho solubilní formu (sTim-3), která je detekována u lidí. Jednou z takových proteázových rodin je A disintegrin and metalloprotease (ADAM). Jako dva její hlavní zástupci byly identifikovány enzymy ADAM 10 a ADAM 17. Přesný mechanismus regulace jejich aktivity zatím není známý, bylo pouze zjištěno, že štěpení prostřednictvím ADAM 17 může být podpořeno phorbol 12-myristát 13-acetátem (PMA), který aktivuje proteinovou kinázu C (PKC). Štěpení je zároveň závislé na přítomnosti koncové intracelulární domény Tim-3. Oproti tomu pro ADAM 10 tato tvrzení neplatí. (Möller-Hackbarth, Dewitz et al. 2013)

Solubilní Tim-3 tvoří poměrně stabilní komplexy s Gal-9, které jsou běžně detekovatelné v periferní krvi. (Silva, Rüegg et al. 2016)

3.4. Exprese na T lymfocytech

Monney, Sabatos et al. (2002) prokázali, že Tim-3 exprimovaný na Th1 lymfocytech je zodpovědný za navození tolerance vůči autoantigenům a zabraňuje tak vzniku autoimunitních poruch. Po jeho zablokování protilátkou se uvolní reakce proti autoantigenům, dojde k produkci prozánětlivých cytokinů (IFN- γ , TNF- α , IL-2) a k aktivaci dalších buněk. V závěru své práce autoři navrhli několik možností, jak může anti-Tim-3 protilátka působit na stimulaci buněk. Jednou z nich je, že existuje inhibiční ligand Tim-3, který se na Tim-3 váže a buňky tak anergizuje – zbavuje efektorové funkce.

Role Tim-3 a jeho ligandu byla poté potvrzena vytvořením umělé solubilní isoformy Tim-3 fúzí Tim-3 s Fc částí lidského imunoglobulinu (fsTim-3). fsTim-3 se chová jako povrchově exprimovaný Tim-3, může se navázat na potenciální ligandy a vysytit je. Blokuje tak důležitou inhibiční signalizační vazbu Tim-3/Tim-3L, která zabraňuje rozvinutí Th1 imunitní reakce. (Sabatos, Chakravarti et al. 2003) (Obr. 2)



Obr. 2: (a) Utlumení imunitní odpovědi řízené Th1 lymfocyty vazbou ligandu Tim-3L. (b) Interakce fsTim-3 s Tim-3L brání inhibici imunitní odpovědi. (Převzato z Meyers, Sabatos et al. (2005))

3.4.1. Interakce s Gal-9

Jako jeden z inhibičních ligandů s afinitou k Tim-3 byl identifikován Gal-9. (Zhu, Anderson et al. 2005) Svou specifickou vazbou na aktivní efektorové pomocné T lymfocyty exprimující Tim-3 vyvolává signalizační dráhou apoptózu. U neaktivních (ligandem nestimulovaných) T lymfocytů apoptózu nespouští. Po navázání Gal-9 nastává fosforylace konzervovaných tyrosinů v koncové cytoplazmatické doméně Tim-3 následovaná vazbou kináz, které signalizačními kaskádami působí inhibičně na produkci cytokinů a uvolněním Ca^{2+} do intracelulárního prostoru indukují apoptózu. (van de Weyer, Philipp S., Muehlfeit et al. 2006) Gal-9 exprimovaný přímo na povrchu buněk sám o sobě apoptózu nespouští, stejně tak ji nespouští ani u Tim-3 deficientních buněk. Buněčná smrt nastane pouze v případě interakce s Tim-3. (Zhu, Anderson et al. 2005)

Citlivost k indukci apoptózy interakcí Gal-9 s Tim-3 byla prokázána i u CD8^+ cytotoxických T lymfocytů, a to opět specificky na plně aktivovaných zralých populacích, nikoliv u naivních T buněk. (Wang, He et al. 2007) Efektorovou funkcí cytotoxického T lymfocytu je oproti pomocným T buňkám schopnost zabíjet jakékoliv buňky, pokud jsou rozpoznány jako defektní – mohou být napadeny virem nebo být maligně transformovány. Dráha Tim-3/Gal-9 tak přímo reguluje a potlačuje i cytotoxickou imunitní obranu.

3.4.2. Vyčerpání T lymfocytů

Tim-3 je sice zodpovědný za navození periferní tolerance, ale při vysoké míře exprese na povrchu T lymfocytů značí tzv. vyčerpaný stav. Této dysfunkce mohou T lymfocyty nabýt po dlouhodobé stimulaci antigeny, které rozeznávají, typicky během chronické virové infekce nebo rakoviny. Za normálních podmínek nezralé T lymfocyty po rozeznání antigenu diferencují v efektorové T buňky, které mají pozměněnou transkripční aktivitu, jsou schopné přímo provádět imunitní dohled a rychle se množí. Po zlikvidování cizorodých agens většina aktivovaných T buněk umírá a malé procento se mění v paměťové buňky. Během dlouhodobého vystavení antigenům není možné z efektorových buněk vytvořit paměťové, a právě takové buňky jsou vyčerpané. Už nejsou schopné plnit své efektorové funkce, neprodukují cytokiny a zvyšují expresi inhibičních receptorů (mezi nimi i Tim-3) na svém povrchu. (Wherry, Kurachi 2015)

Jedním z možných mechanismů indukce vyčerpání v závislosti na Tim-3 u T buněk je hromadění neaktivní formy lymphocyte-specific tyrosine kinase (Lck), která v T lymfocytech navyšuje produkci IFN- γ a také hlavně IL-2, cytokinu podporujícího expanzi imunitních buněk. Ke dvěma nefosforylovaným tyrosinům (Tyr256 a Tyr263) v koncové intracelulární doméně Tim-3 se totiž váže HLA-B-associated transcript 3 (Bat3), který váže aktivní formu Lck a reguluje tím signalizaci T-buněčného receptoru. T lymfocyt, ač přirozeně exprimuje Tim-3, pak nejeví známky dysfunkce a může se zapojit do imunitní odpovědi. Vazbou Gal-9 však dojde k fosforylaci tyrosinů, na které se Bat3 už nemůže navázat. V buňkách se pak hromadí neaktivní Lck neschopná signalizovat produkci cytokinů a imunitní aktivita může být tímto způsobem potlačena. Bylo také zjištěno, že u vyčerpaných T buněk defektních v proliferaci a produkci cytokinů se snižuje exprese Bat3. Při absenci Bat3 buňky dokonce zvyšují expresi Tim-3 a tím zesilují vyčerpání. (Rangachari, Zhu et al. 2012)

Vyčerpání T lymfocytů vyvolané nádorem je zatím nejvíce spojováno s vysokou expresí inhibičního receptoru PD-1 (programmed cell death protein 1). Vyskytuje se spolu s Tim-3 a dvojité pozitivní PD-1⁺ Tim-3⁺ T buňky vykazují vůbec nejvíce vyčerpaný stav v porovnání s populacemi PD-1⁺ Tim-3⁻ nebo PD-1⁻ Tim-3⁻ – nejenže nejsou schopné plnit efektorové funkce, ale produkují nejméně prozánětlivých cytokinů. Tim-3 je ovšem možné považovat za relevantní marker vyčerpání i sám o sobě bez přítomnosti koexprimovaného PD-1. Nejlepších výsledků v obnovení efektorových funkcí anergizovaných T lymfocytů je však možné dosáhnout až po zablokování obou inhibičních receptorů, tedy Tim-3 i PD-1. (Fourcade, Sun et al. 2010)

Důležité je, že podobné výsledky se podařilo prokázat i v případě, kdy je vyčerpání T lymfocytů vyvoláno přítomností AML. Periferní pomocné i cytotoxické T lymfocyty AML pacientů mají zvýšenou povrchovou expresi Tim-3 a PD-1 v porovnání se zdravými kontrolami. (Li, Chen et al. 2014) Samotný Tim-3 je dostatečný k identifikování vyčerpaných T buněk a není potřeba současné koexprese PD-1 pro navození anergie, subpopulace dvojité pozitivních T lymfocytů se opět vyznačuje nejvíce sníženou produkcí cytokinů IFN- γ , TNF- α a IL-2 v odpovědi na buňky AML. V průběhu progresu AML dokonce dochází k postupnému zvyšování exprese obou inhibičních receptorů na povrchu buněk, spojenému s vyčerpáním T lymfocytů chronicky stimulovaných leukemickými buňkami. Kombinovaným zablokováním lze i v případě AML zvrátit dysfunkci T lymfocytů a znovu obnovit jejich aktivitu. (Zhou, Munger et al. 2011)

Vlivem nádorového mikroprostředí kostní dřeně, které je centrem bující leukémie, v porovnání s vlivem na vyčerpání T lymfocytů v periferní krvi, se zabývala výzkumná skupina Tan, Yu et al. (2020). U pacientů s AML se většina CD4⁺ Tim-3⁺ pomocných T lymfocytů dominantně nacházela v kostní dřeni v porovnání s obsahem těchto buněk v periferní krvi. Koncentrované nádorové buňky tak nejspíš přitahují pomocné T lymfocyty ke zdroji chronické stimulace, ale zároveň zabraňují nabytí plné efektorové funkce. V populaci rezidentních vyčerpaných T buněk kostní dřeně byl zastoupen i podíl buněk koexprimujících jak PD-1, tak Tim-3. Významné množství dvojité pozitivních dysfunkčních T lymfocytů v periferní krvi pak bylo pozorováno u pacientů neschopných dosáhnout kompletní remise po prvním kole chemoterapie. Experimenty ovšem autoři prováděli pouze na malé kohortě 15 pacientů s AML, je proto vhodné provést studii většího rozsahu, aby se potvrdila případná významnost objevu.

Mezi další T buňky ovlivněné povrchovou expresí Tim-3 ve vztahu k AML můžeme zařadit i Vδ2 T lymfocyty. (Wu, Feng et al. 2020) Vδ2 T lymfocyty patří mezi γδ T buňky, které se od klasických (již známých pomocných a cytotoxických) liší ve složení T-buněčného receptoru a rozeznávanými antigeny. Hlavní řetězce, které tvoří receptor u těchto buněk, jsou nazvány γ a δ, odtud pochází i označení populace. Vδ2 T lymfocyty jsou nejčastější populací γδ T buněk u lidí (tvoří zhruba 5 % všech cirkulujících T lymfocytů). Klasické lymfocyty mají receptor složený z řetězců α a β a rozeznávají krátké úseky peptidů vystavených na povrchu buněk pomocí major histocompatibility complex (MHC) glykoproteinů. Naproti tomu γδ T buňky rozeznávají antigeny peptidového i nepeptidového charakteru, nevázané na MHC glykoproteiny. Mnoho maligních buněk vykazuje nadměrnou produkci takových antigenů důsledkem změn v metabolických drahách a mohou se tak stát terčem Vδ2 T lymfocytů, jejichž účast na protinádorové imunitě je potvrzena. (Fisch, Malkovsky et al. 1990) Je zajímavé, že pokud Vδ2 T buňky exprimují na povrchu PD-1, není nijak zhoršena jejich funkce. Ovšem při současné expresi Tim-3 vykazují nejvíce dysfunkční charakter. Inhibiční dráha Tim-3 tak u této populace buněk hraje hlavní roli v navození vyčerpání. (Wu, Feng et al. 2020)

3.5. Exprese na NK buňkách

NK buňky se vyznačují cytotoxickou aktivitou podobně jako cytotoxické CD8⁺ T lymfocyty – umí zabíjet infikované nebo nádorové buňky, dále i všechny volně přítomné patogeny, které se nemohou prokázat tělu vlastními znaky. Zároveň produkují aktivační cytokiny, především IFN- γ . Mezi všemi leukocyty mají zralé NK buňky přirozeně nejvyšší procento exprese Tim-3 a oproti T lymfocytům vysoká exprese Tim-3 slouží jako marker plně maturovaných aktivovaných efektorových buněk. (Ndhlovu, Lopez-Vergès et al. 2012) Vazbou Gal-9 na Tim-3 u nich nedochází k inhibici, vazba buňku naopak aktivuje, indukuje zvýšení cytokinové produkce IFN- γ i proliferačního potenciálu. I množství exprese Tim-3 je v návaznosti na aktivaci zvýšeno a Tim-3 u NK buněk může sloužit jako koaktivační receptor. Jediné, na co aktivace vazbou Gal-9 nemá vliv, je degranulace NK buňky. (Gleason, Lenvik et al. 2012)

Zdá se ovšem, že funkce Tim-3 na NK buňkách se může lišit v různých kontextech. da Silva, Gallois et al. (2014) totiž pozorovali zcela odlišné chování Tim-3⁺ NK buněk u pacientů s pokročilým melanomem. Exprese Tim-3 v tomto případě charakterizovala populaci dysfunkčních vyčerpaných NK buněk neschopných se množit, sekretovat cytokiny či konat efektorové cytotoxické funkce. Celkově vyšší množství Tim-3 na povrchu NK buněk značilo zhoršenou prognózu, a navíc s vývojem melanomu rostlo. Podáním protilátek proti Tim-3 bylo možné vyčerpaný fenotyp zvrátit, je tak jisté, že inhibiční dráha Tim-3 způsobila vyčerpání. Možným vysvětlením vzájemně rozporných výsledků z různých studií zaměřených na NK buňky je také nejistá definice "vyšší" exprese Tim-3. Není vyloučeno, že podobně jako je tomu u PD-1, středně vysoké množství Tim-3 je spojeno s aktivovaným stavem NK, zatímco další zvýšení exprese už s vyčerpáním.

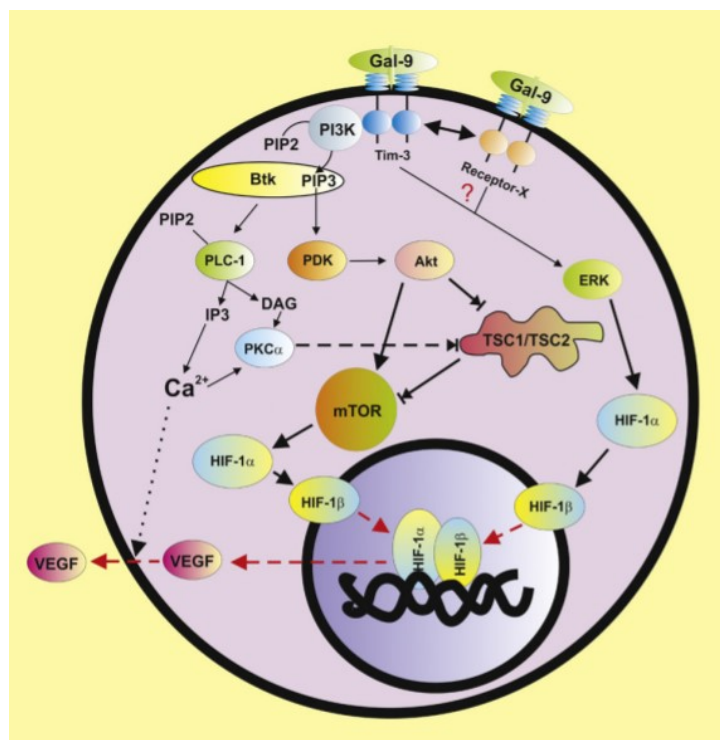
4. Tim-3 a AML

4.1. Tim-3 jako marker leukemických kmenových buněk

Zatímco na povrchu zdravých HKB se Tim-3 nenachází, jeho přítomnost byla opakovaně potvrzena na povrchu LKB u AML. Vyskytuje se na povrchu většiny LKB (definovaných jako CD34-pozitivní a CD38-negativní leukemické blasty) u všech FAB typů AML kromě promyelocytické M3. Na základě toho byl Tim-3 navržen jako marker umožňující rozlišit LKB od normálních hematopoetických progenitorů, což může mít význam zejména při analýze vzorků z kostní dřeně. (Kikushige, Shima et al. 2010, Jan, Chao et al. 2011)

4.2. Exprese Tim-3 na leukemických blastech

Tim-3 se exprimuje mimo LKB i na postupně diferencovaných leukemických blastech. (Jan, Chao et al. 2011, Silva, Rüegg et al. 2016, Kikushige, Shima et al. 2010) V buňkách AML dochází přes vazbu Gal-9 na Tim-3 k aktivaci mammalian target of rapamycin (mTOR) dráhy. mTOR v buňkách působí jako hlavní regulátor buněčného růstu, metabolismu a odpovědi na stres. Pokud je takto aktivován v AML buňkách, má podobné účinky jako stem cell factor (SCF), hlavní růstový faktor HKB, který zvyšuje schopnost přežití buněk a přispívá k jejich sebeobnově. Míra stimulace je ovšem v případě Tim-3 menší. Po vazbě Gal-9 signalizační fosforylační kaskádou dojde přes aktivaci mTOR k aktivaci transkripčního komplexu hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) (Prokhorov, Gibbs et al. 2015), který je u zdravých HKB zodpovědný za adaptaci metabolismu pro přežití v hypoxickém prostředí kostní dřeně a zachování si funkce po celý lidský život. (Srikanth, Sunitha et al. 2015) HIF-1 zvyšuje například intenzitu glykolýzy, která je pak hlavním zdrojem energie pro buňku, a expresi a sekreci vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), který podporuje růst kapilár. Zmíněná kaskáda celkově přispívá k proleukemickému stavu buněk, které v neprokysličeném prostředí kostní dřeně mohou intenzivně růst. (Prokhorov, Gibbs et al. 2015) (Obr. 3)



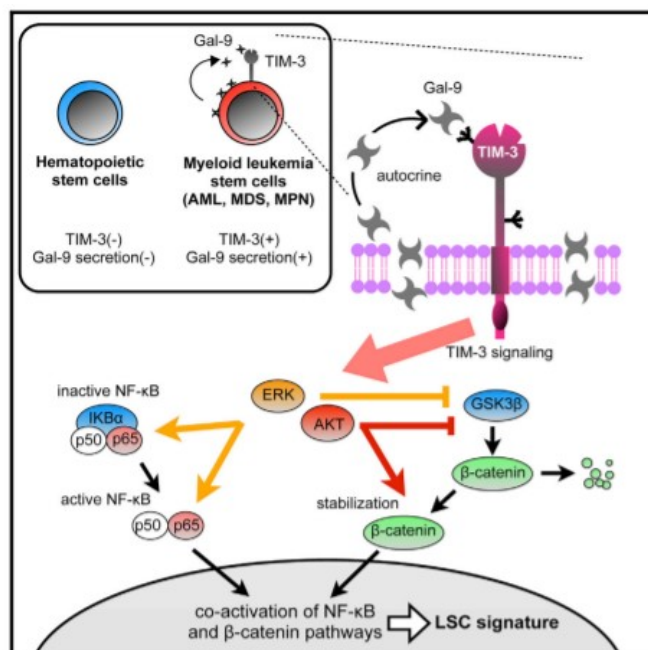
Obr. 3: Vazbou Gal-9 na Tim-3 se aktivují kinázy PKC a Akt, které aktivují mTOR a HIF-1. HIF-1 je zároveň aktivován i ERK kinázou. Výsledkem signalizace je zvýšená exprese a sekrece VEGF a intenzivní glykolýza. (Převzato z Prokhorov, Gibbs et al. (2015))

Zdravé raně progenitorové buňky Tim-3 neexprimují. Ale tím, jak v hematopoetické řadě dozrávají, postupně pozměňují svůj expresní profil a místo receptoru pro SCF exprimují právě Tim-3. Výskyt Tim-3 pak přirozeně začíná na progenitoru pro granulocyty a monocyty. (Kikushige, Shima et al. 2010, Jan, Chao et al. 2011) Zajišťuje jim aktivaci mTOR dráhy stejně jako v případě buněk AML. Míra exprese na zdravých leukocytech však není tak vysoká jako u maligních leukemických buněk. (Gonçalves Silva, Gibbs et al. 2015)

4.3. Autokrinní smyčka Tim-3/Gal-9

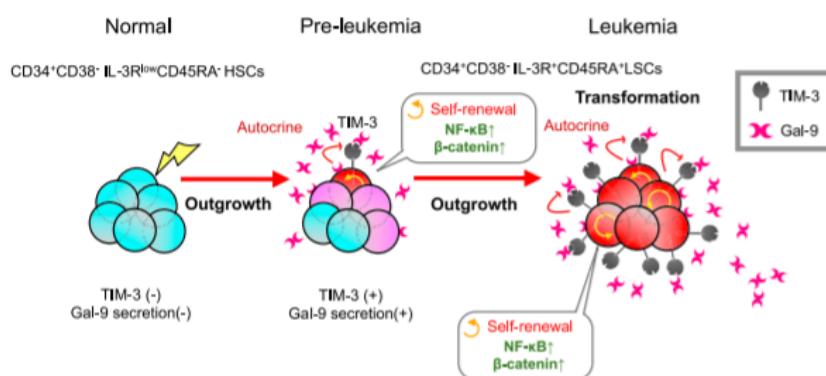
Transplantace lidských Tim-3⁺ LKB do myši vedla k rozvoji AML, avšak v případě transplantace Tim-3⁻ LKB se tak nestalo. Výsledek tohoto experimentu naznačuje, že LKB pro svou nádorovou aktivitu potřebují Tim-3. (Kikushige, Shima et al. 2010) Jak už bylo uvedeno výše, děje se tak na mimo jiné prostřednictvím vazby Gal-9. U AML pacientů bylo detekováno zvýšené množství Gal-9 v séru oproti zdravým pacientům. Gal-9 je totiž aktivně sekretován leukemickými buňkami do okolí a následně je pak využit i v podobě autokrinní

signalizace pro zachování jejich růstového potenciálu. Ligací Tim-3 a Gal-9 dojde k fosforylaci tyrosinů na koncové cytoplazmatické doméně Tim-3 a k vazbě a fosforylaci ERK a Akt kináz. Ty pak aktivují nejen již zmíněnou mTOR dráhu, ale i transkripční faktor NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (Kikushige, Miyamoto et al. 2015), který je při maligní transformaci klíčový. NF- κ B zesiluje transkripci β -catenin, který při markantně zvýšené aktivaci umožní re-expresi původních znaků a receptorů typických pro kmenovou buňku. (Schwitalla, Fingerle et al. 2013) Samotná β -cateninová dráha je vazbou Tim-3/Gal-9 také aktivována. Obě kinázy ERK a Akt inhibují buněčný protein GSK3 β , který za normálního stavu váže ubiquitin k β -catenin, čímž ho směřuje k degradaci. Tím zabraňuje aktivaci β -catenin a jeho transportu do buněčného jádra, kde by mohl stimulovat obnovu LKB. Sekrece Gal-9 byla potvrzena jako zásadní pro funkci autokrinní smyčky Tim-3/Gal-9 podporující obnovu většiny leukemických buněk, poněvadž neutralizací Gal-9 bylo zainhibováno rozvinutí AML v imunodeficientních myších. (Kikushige, Miyamoto et al. 2015) (Obr. 4)



Obr. 4: AML buňky produkují Gal-9, který vazbou na Tim-3 exprimovaný na povrchu AML buněk aktivuje NF- κ B a β -cateninové dráhy zodpovědné za zachování charakteru kmenových buněk. (Převzato z Kikushige, Miyamoto et al. (2015))

Dalším významným objevem bylo, že vyšší množství Gal-9 v krevním séru se vyskytuje už i v pre-leukemických myeloidních poruchách jako je například MDS. Ligace Tim-3/Gal-9 stimuluje NF- κ B a β -catenin v AML transformovaných z MDS stejně jako u AML diagnostikovaných *de novo*. Zvýšená sekrece Gal-9 může znamenat předstupuň progresu leukémie a autokrinní smyčka Tim-3/Gal-9 mechanismus v expanzi a transformaci maligních myeloidních buněk. Je tak možné, že pre-leukemické HKB v kostní dřeni přerostou zdravé HKB. Nabízí se tak možnost dalšího využití současných poznatků v léčbě – přerušením autokrinní smyčky, která je velmi důležitá pro vývoj malignity, by bylo možné léčit nejen AML, ale i pre-leukemické pacienty. (Kikushige, Miyamoto et al. 2015) (Obr. 5)



Obr. 5: V pre-leukemických poruchách bylo prokázáno zvýšené množství Gal-9 i Tim-3. Ligací obou proteinů bylo dosaženo stejného efektu u pre-leukemických HKB jako u LKB, totiž zesílené buněčné obnovy. Buňky tak v kostní dřeni mohou přerůstat zdravé HKB a plně rozvinout AML. (Převzato z Kikushige, Miyamoto et al. (2015))

4.4. Vzájemné ovlivnění exprese Tim-3 a Gal-9 v buňkách AML

Jelikož je dráha Tim-3/Gal-9 tak významná pro zachování AML, bylo by nasnadě u leukemických buněk předpokládat existenci molekulární spojky mezi množstvím exprese a sekrece Tim-3 a Gal-9. (Silva, Rüegg et al. 2016)

Vyřazení genu pro Gal-9 v AML linii U-937 vedlo k signifikantnímu snížení intracelulárního množství Tim-3 a vyřazení Tim-3 u stejné linie zapříčinilo pokles sekretovaného množství Gal-9, ne však jeho množství v buňce. Jev naznačuje, že se oba proteiny vzájemně ovlivňují – Gal-9 stimuluje genovou expresi Tim-3, Tim-3 hraje roli v sekreci Gal-9 ven z leukemických buněk. (Silva, Rüegg et al. 2016) Gal-9, jak již bylo zmíněno, neobsahuje signální sekvenci potřebnou k lokalizaci v buňce, v tomto případě k zajištění exocytosy. (Chabot, Kashio et al. 2002) I jiné typy buněčných populací sekretují Gal-9, aniž by exprimovaly Tim-3. Existují tedy i jiné proteiny schopné směřovat Gal-9 ven z intracelulárního prostoru, Tim-3 však takto funguje specificky u myeloidních leukemických buněk. (Silva, Rüegg et al. 2016)

Signalizační smyčka vazbou Gal-9 na Tim-3, která se podílí na zvýšení míry translace a sekrece obou proteinů, vypadá následovně: po navázání Gal-9, jak už víme z předchozích kaskád, se fosforylují tyrosiny na koncové intracelulární doméně Tim-3. Fosforylací se aktivuje signalizační kaskáda zahrnující kinázy Akt a PKC, které zvyšují aktivitu mTOR. (Podáváním inhibitoru PKC došlo k signifikantně negativní regulaci mTOR. (Prokhorov, Gibbs et al. 2015)) mTOR dráha aktivuje specifické translační faktory, čímž zesiluje translaci obou proteinů Tim-3 i Gal-9. Vyšší množství Tim-3 je pak schopné zajistit sekreci vyššího množství vázaného Gal-9. V případě buněk AML je přitom sekrece Gal-9 na Tim-3 závislá. (Silva, Rüegg et al. 2016) Z buněčného povrchu je Tim-3 samotný i v komplexu s Gal-9 odštěňován proteázami. (Gonçalves Silva, Yasinska et al. 2017)

Inhibitor mTOR dráhy výrazně snížil množství sekretovaného sTim-3, což ukazuje na možnou roli mTOR při odštěhnutí Tim-3 z povrchu buněk. V rámci experimentů bylo i ověřeno, zda se na sekreci Tim-3 v komplexu s Gal-9 nepodílí i ADAM 10 nebo 17 (proteázy, které odštěpují sTim-3 (Möller-Hackbarth, Dewitz et al. 2013)) Po ošetření specifickými inhibitory těchto proteáz byla ale sekrece Tim-3 snížena jen minimálně, v proteolýze tak figuruje i jiné mechanismy. (Gonçalves Silva, Yasinska et al. 2017)

Vazbou Gal-9 na Tim-3 se tak zintenzivňují všechny výše popsané mechanismy pro posílení přežívání buněk AML a zároveň i samotná exprese/sekrece obou proteinů.

4.5. Význam dráhy Tim-3/Gal-9 v modulaci imunitního systému

4.5.1. Význam dráhy v modulaci T lymfocytů

V kapitole o expresi Tim-3 na T lymfocytech jsou shrnuty účinky stimulace Tim-3 pomocí ligandů, především Gal-9. S předchozími poznatky je tedy možné odpovědět na otázku významu povrchové exprese Tim-3 na buňkách akutní myeloidní leukémie. AML blasty tedy nejen přes signalizační dráhu Tim-3 podporují svoji sebeobnovu a přežití, ale zajišťují i zvýšenou extracelulární koncentraci Gal-9, který právě svou vazbou na Tim-3 na povrchu T buněk spouští inhibiční signály vedoucí k vyčerpání a k apoptóze T buněk.

Zajímavou roli v účinku vazby Gal-9 může hrát i zjištění Gonçalves Silva, Yasinska et al. (2017) ukazující, že Gal-9 má v komplexu s Tim-3 konformaci odlišnou od té, kterou zaujímá bez vazebných interakcí. Tím, že se Tim-3 při transportu ven z leukemických buněk váže k jedné ze dvou CRD Gal-9, může nejspíš zvyšovat sílu dalších vazebných interakcí Gal-9. Mezi takové interakce pak samozřejmě může spadat i vazba k dalšímu Tim-3 na povrchu buněk imunitního systému.

Specifický účinek na T lymfocyty má kromě sekretovaného Gal-9 i sTim-3 odštěpený z povrchu leukemických buněk proteázami. Vazbou na T lymfocyty (zde nebyl blíže specifikován ligand) inhibuje sekreci cytokinů, zejména IL-2 a IFN- γ . Zabraňuje tak jednak proliferaci T lymfocytů a dalších imunitních buněk (například NK buněk, pro které je IL-2 také signálem k proliferaci), ale i celkové prozánětlivé stimulaci buněk cytokinem IFN- γ . (Geng, Zhang et al. 2006) Je potvrzeno, že v plazmě pacientů s AML je množství sTim-3 výrazně vyšší v porovnání se zdravými kontrolami a množství volného IL-2 je naopak nižší. AML buňky tak mají následkem odstříhnutí Tim-3 ze svého povrchu další možnost potlačení imunitní obrany. (Gonçalves Silva, Yasinska et al. 2017)

Mezi další defektní projevy v interakci imunitního systému s buňkami AML patří i neschopnost vytvořit funkční imunologickou synapsi. T lymfocyty mají při spojení s leukemickými buňkami pozměněnou transkripční aktivitu. Odlišnosti v genové expresi se promítají do dynamiky cytoskeletární aktinové sítě, která je pro formování synapse důležitá. Schopnost konjunkce s leukemickými buňkami je zachovaná – T lymfocyt bezpečně rozpozná, že se jedná o hrozbu, avšak není schopen plnit efektorovou funkci aktivací signalizačních kaskád. (Le Dieu, Taussig et al. 2009) Možné vysvětlení může plynout z výsledků pokusů Clayton, Haaland et al. (2014). Tito autoři prokázali, že se Tim-3 nachází

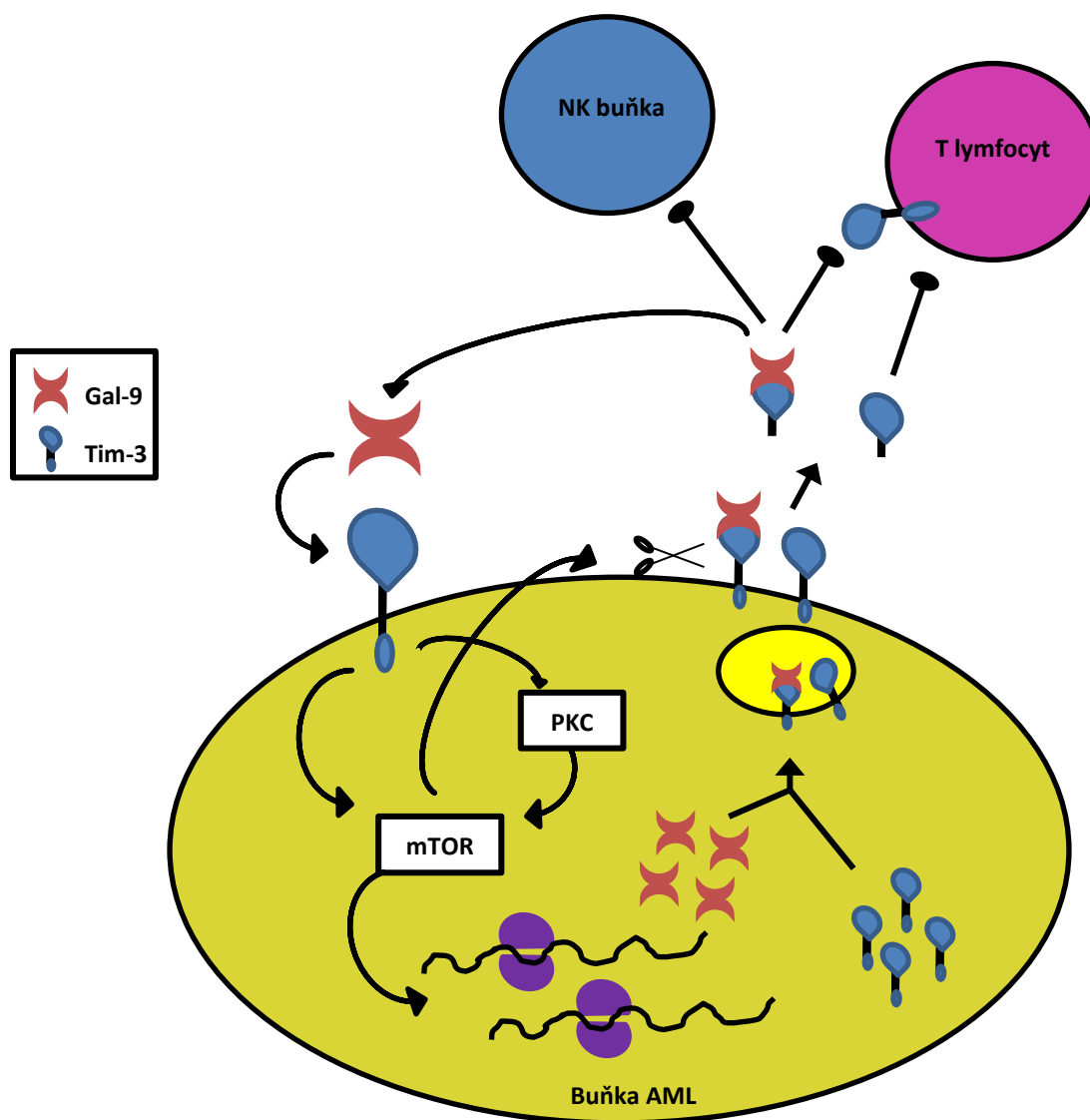
v lipidových raftech účastnících se tvorby imunologických synapsí, kde se překvapivě podílí na tvorbě jejich stabilních forem. Zároveň však prokázali, že u defektních imunologických synapsí Tim-3 interaguje s neaktivovanou formou Lck kinázy. Aktivní forma Lck, jak již víme, zajišťuje důležité aktivační transkripční procesy T lymfocytů. To, že Tim-3 váže nefosforylovanou Lck naznačuje působení fosfatáz. Tim-3 však s fosfatázami neinteraguje přímo, ale prostřednictvím vazby s Gal-9, který díky svým dvěma CRD váže i receptorové fosfatázy CD45 a CD148 a tím zajišťuje negativní regulaci Lck. Buňky AML tak povrchovou expresí Gal-9 vázaného na Tim-3 mohou unikat imunitnímu systému i během vzájemné bezprostřední interakce.

4.5.2. Význam dráhy v modulaci NK buněk

Nejen u T lymfocytů je prokázána odlišná genová exprese a neschopnost tvořit kvalitní imunologické synapse při interakci s AML buňkami, zakončené plnohodnotnou cytolytickou reakcí. V případě NK buněk dochází k podobnému jevu, kdy po spojení s leukemickými buňkami vykazují sníženou cytotoxickou funkci. Hlavním problémem je defektní synchronizace polarizace cytoskeletární sítě a lytických granulí vůči AML buňkám. (Khaznadar, Henry et al. 2014) U NK buněk Tim-3 nezpůsobuje celkovou inhibici jejich aktivity ani po vazbě Gal-9. Golden-Mason, McMahan et al. (2013) však objevili, že vazba Gal-9 na NK buňku (v tomto případě se jedná o vazbu na některý jiný ligand zcela nezávisle na Tim-3) tlumí různé imunoaktivační geny, mezi nimi i geny spojené s cytotoxicitou. Koncentrace Gal-9 v pokusech byla sice relativně vysoká v porovnání s koncentracemi Gal-9 použitými ve výzkumu Gleason, Lenvik et al. (2012), kde byly potvrzeny posilující účinky Gal-9 ve vazbě na Tim-3, ale AML buňky celkově produkují vyšší množství Gal-9 (Silva, Rüegg et al. 2016) Je tedy možné, že za sníženou cytotoxicitou NK buněk vůči AML buňkám stojí Gal-9, který je z AML buněk uvolňován díky vazbě na Tim-3.

4.6. Shrnutí možných následků exprese Tim-3 na AML buňkách

Důležité informace z kapitoly 4 jsou přehledně shrnuty v obrázku 6.



Obr. 6: Souhrnný obrázek ilustrující následky exprese Tim-3 na buňkách AML. Ligace Gal-9 s Tim-3 přenáší aktivační signál na PKC a mTOR dráhu, která zvyšuje translaci Gal-9 i Tim-3 na ribozomech. Tim-3 pak slouží jako translokační činitel Gal-9 na membránu. K proteolýze – odštěpení od povrchu – rovněž přispívá mTOR, uvolňuje se sTim-3, který inhibuje T lymfocyty, nebo komplex Tim-3 s Gal-9, který může inhibovat NK buňky nebo interagovat s dalšími molekulami Tim-3 přítomnými na povrchu buněk – ať už autokrinně na těchže buňkách, na jiných leukemických buňkách, u kterých zajistí jejich obnovu a lepší přežití, nebo na T lymfocytech, jejichž funkci může naopak inhibovat. (vlastní zpracování)

5. Klinický význam exprese Tim-3 na povrchu buněk AML

Následující část práce se bude zabývat teoretickými možnostmi využití exprese Tim-3 na povrchu buněk AML v klinické praxi. Většina experimentů však zatím buď vůbec nebyla provedena na pacientech nebo nebyla postavena na dostatečném množství pacientů, proto tyto práce spíše poskytují podklady pro formulaci hypotéz a kladou důraz na prozkoumání ve větším měřítku.

5.1. Využití Tim-3 jako selektivního terapeutického cíle

První význam inhibice Tim-3 prokázali Kikushige, Shima et al. (2010) v pokusech na myších. Rozvoj AML může začít i z malé populace sebeobnovujících se LKB, proto získáním selektivního markeru, na který se zacílí léčba, bude možné klon eradikovat. Důležité je, aby terapeutický cíl nebyl exprimován na povrchu normálních HKB, jinak by došlo k úplnému selhání hematopoézy. Výhodou je i exprese cílené molekuly na diferencovanějších leukemických blastech umožňující rychlejší a efektivnější léčbu – odstranění původce dysfunkčních blastů (tj. LKB), stejně jako blastů samotných. V případě zdravých progenitorových buněk by exprese Tim-3 nevadila, protože pokud by byly zachovány HKB, zdravá hematopoéza by mohla být později obnovena. Autoři vyzkoušeli, zda jako takový cíl bude fungovat Tim-3. Podáváním protilátky proti Tim-3 myším s implantovanou AML byla selektivně zablokována proliferace LKB i leukemických blastů. Tím bylo zabráněno rozvoji leukémie a zároveň nebyla nijak narušena činnost HKB. Ošetřené buňky pak byly transplantovány do dalších myší, kde nedošlo k obnovení AML. V myších tedy byla potvrzena role Tim-3 jako vhodného terapeutického cíle, ale nemyslím si, že bylo ve studii možné obsáhnout všechny variace subtypů AML a různých mutací, které jsou běžně přítomné u pacientů.

Teoretickou výhodou takového terapeutického cíle na LKB, umožňujícího jejich eliminaci, by byla i možnost přečištění autologních transplantátů kostní dřeně od LKB ve formě *ex vivo* chemoterapie. Transplantace by fungovala v podobě podpůrné terapie pro pacienty, u kterých není možné dosáhnout kompletní remise. (Jan, Chao et al. 2011) Výzkum v této souvislosti však zatím nebyl proveden.

5.2. Význam v diagnostice

Významným přínosem by bylo i využití exprese Tim-3 k rozlišení přežívajících leukemických buněk při hodnocení efektivity léčby AML analýzou krevního vzorku průtokovou cytometrií. Výzkum ale po porovnání množství exprese Tim-3 na leukemických blastech se zdravými myeloblasty a blasty po čerstvé chemoterapii ukázal, že se sice leukemické blasty opravdu vyznačují vysokou mírou exprese Tim-3 (>90%) v porovnání se zdravými myeloblasty, avšak zvýšená exprese se objevuje i na patrně zdravých myeloblastech po chemoterapii. (Roth, Garner et al. 2013) Je možné, že jde o následek neúplné rekonstituce normální hematopoézy po chemoterapii a zvýšené relativní zastoupení Tim-3⁺ buněk odpovídá přednostní obnově progenitorů pro granulocyty a monocyty, které Tim-3 přirozeně exprimují. Tim-3 by bylo patrně možné použít pro rozlišení LKB a HKB, v tom případě by ale bylo třeba hodnotit pouze subpopulaci CD34⁺ CD38⁻.

Agresivita AML by mohla být charakterizována i celkovým množstvím markerů exprimovaných na povrchu leukemických buněk, které nějakým způsobem zhoršují prognózu AML. Pod agresivitou AML rozumíme v tomto případě neúčinnost konvenční chemoterapie v podobě relapsu nebo také primární či získané rezistence k chemoterapii. Darwish, Sudha et al. (2016) spolu s Tim-3 analyzovali ještě další leukemické markery u všech FAB typů AML. Prokázali sice, že přežití AML pacientů s nižším množstvím rizikových markerů bylo delší než u pacientů s vyšším množstvím, ale další specifické poznatky například ohledně kombinací markerů se nepodařilo prokázat. Autoři pouze potvrdili, že přežití LKB po zablokování Tim-3 bylo zdaleka nejnižší. Data možná naznačují určité vodítko ve spojitosti míry exprese Tim-3 a dalších proteinů s agresivitou AML, ale výzkum probíhal pouze na malé kohortě pacientů diagnostikovaných *de novo* (celkem pouze 40 pacientů všech AML skupin dohromady) a nebyly zkoumány případy s předchozími poruchami (MDS) nebo po již prodělané chemoterapii.

Signifikantnějších výsledků dosáhli Dama, Tang et al. (2019). Zvýšená exprese Gal-9 na leukemických blastech společně se zvýšenou expresí Tim-3 na rezidentních T lymfocytech kostní dřeně charakterizovala pacienty s relapsy po první fázi chemoterapie. U pacientů, kteří dosáhnou kompletní remise, je exprese v obou případech nižší. Intenzita exprese obou proteinů tak značí agresivnější AML a predikuje zhoršenou prognózu pro pacienty. Kombinovaná léčba v podobě chemoterapie a inhibice Tim-3/Gal-9 dráhy by tak byla vhodným postupem při dalších kolech terapie. Pro klinické účely je však opět nutné provést studii na větší kohortě pacientů.

5.3. Kombinační terapie zaměřená na více znaků AML

Ideální marker LKB u lidí zatím nebyl nalezen a vzhledem k heterogenitě onemocnění je dobře možné, že ani neexistuje. Většina regulátorů je totiž v menší či větší míře přítomna mimo AML buňky i na dalších buňkách kostní dřeně. Kombinační terapie u AML zaměřená na více povrchových markerů může cílit specifičtěji na leukemické buňky, vyvarovat se tak vedlejších toxických účinků vůči ostatním buňkám a zároveň snížit riziko relapsu u pacientů. Ve studii Haubner, Perna et al. (2019) analyzovali koexpresní profil proteinů na AML buňkách a identifikovali dvě dvojice antigenů, které byly v nejvyšší míře přítomny u AML buněk v porovnání se zdravými hematopoetickými buňkami, a to CD33 + Tim-3 a CLL1 + Tim-3. Cílením terapie na uvedené koexprimované znaky by bylo možné eliminovat nadměrnou toxicitu a zesílit terapeutické účinky na rezistentní leukemické buňky, které jsou hlavní příčinou relapsů AML. Autoři pak ve studii navrhuji nejen možnosti teoretického využití jejich poznatků v kontextu protilátkové léčby, ale i při konstrukci CAR T lymfocytů.

6. Závěr

Hlavním cílem práce bylo představit roli Tim-3 v souvislosti s AML. Nejdříve jsem nastínila podstatu AML a dosavadní postupy v léčbě. Dále jsem se zaměřila na samotný Tim-3 a na vybrané účinky jeho exprese na T lymfocytech a NK buňkách. (Existuje velké množství dat ohledně funkce Tim-3, která se liší nejen v rámci různých buněčných typů, ale i v různých kontextech na těchto buňkách. Kapitola tak nepokrývá veškeré dostupné poznatky, předkládá pouze poznatky relevantní pro AML.) Stěžejní část práce pojednává o významu exprese Tim-3 na leukemických buňkách. Zjistila jsem, že stimulací Tim-3 se aktivuje množství signálních drah podporujících obnovu a přežití buněk. (Kikushige, Miyamoto et al. 2015, Prokhorov, Gibbs et al. 2015) Kromě toho Tim-3 umožňuje sekreci Gal-9, který inhibuje funkci imunitních buněk a přispívá tak k úniku leukemických blastů před imunitním dohledem. (Gonçalves Silva, Yasinska et al. 2017) Zvýšená exprese Tim-3 je navíc u AML pacientů nalézána nejen na leukemických buňkách, ale také na T lymfocytech, u kterých je spojena s vyčerpaným stavem. (Zhou, Munger et al. 2011) V nádorovém mikroprostředí kostní dřeně je soustředěno velké množství takto dysfunkčních buněk, patrně následkem chronické stimulace T lymfocytů. (Tan, Yu et al. 2020)

Možným klinickým využitím inhibice Tim-3 a Gal-9 se zabývalo několik výzkumných týmů, které potvrdily pozitivní účinky zablokování této dráhy. Studie však byly provedeny na malých kohortách pacientů, proto je potřeba dalšího výzkumu. Imunoterapie, stejně jako chemoterapie a transplantace, není bez rizik a vedlejších účinků. Zablokování Tim-3/Gal-9 dráhy sice může vést k účinné eliminaci leukemických buněk, ale také například k rozvoji autoimunitních procesů. (Andersen 2014)

Seznam použité literatury

*ANDERSEN, M.H., 2014. The targeting of immunosuppressive mechanisms in hematological malignancies. *Leukemia*, **28**(9), pp. 1784-1792.

ANDERSON, A.C., ANDERSON, D.E., BREGOLI, L., HASTINGS, W.D., KASSAM, N., LEI, C., CHANDWASKAR, R., KARMAN, J., SU, E.W., HIRASHIMA, M., BRUCE, J.N., KANE, L.P., KUCHROO, V.K. and HAFLER, D.A., 2007. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science (New York, N.Y.)*, **318**(5853), pp. 1141-1143.

CAO, E., ZANG, X., RAMAGOPAL, U., MUKHOPADHAYA, A., FEDOROV, A., FEDOROV, E., ZENCHECK, W., LARY, J., COLE, J., DENG, H., XIAO, H., DILORENZO, T., ALLISON, J., NATHENSON, S. and ALMO, S., 2007. T Cell Immunoglobulin Mucin-3 Crystal Structure Reveals a Galectin-9-Independent Ligand-Binding Surface. *Immunity*, **26**, pp. 311-21.

CHABOT, S., KASHIO, Y., SEKI, M., SHIRATO, Y., NAKAMURA, K., NISHI, N., NAKAMURA, T., MATSUMOTO, R. and HIRASHIMA, M., 2002. Regulation of galectin-9 expression and release in Jurkat T cell line cells. *Glycobiology*, **12**(2), pp. 111-118.

CLAYTON, K.L., HAALAND, M.S., DOUGLAS-VALE, M.B., MUJIB, S., CHEW, G.M., NDHLOVU, L.C. and OSTROWSKI, M.A., 2014. T cell Ig and mucin domain-containing protein 3 is recruited to the immune synapse, disrupts stable synapse formation, and associates with receptor phosphatases. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **192**(2), pp. 782-791.

DA SILVA, I.P., GALLOIS, A., JIMENEZ-BARANDA, S., KHAN, S., ANDERSON, A.C., KUCHROO, V.K., OSMAN, I. and BHARDWAJ, N., 2014. Reversal of NK-cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade. *Cancer Immunology Research*, **2**(5), pp. 410-422.

DAMA, P., TANG, M., FULTON, N., KLINE, J. and LIU, H., 2019. Gal9/Tim-3 expression level is higher in AML patients who fail chemotherapy. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, **7**(1), pp. 175.

DARWISH, N.H.E., SUDHA, T., GODUGU, K., ELBAZ, O., ABDELGHAFAR, H.A., HASSAN, E.E.A. and MOUSA, S.A., 2016. Acute myeloid leukemia stem cell markers in prognosis and targeted therapy: potential impact of BMI-1, TIM-3 and CLL-1. *Oncotarget*, **7**(36), pp. 57811-57820.

*DÖHNER, H., ESTEY, E., GRIMWADE, D., AMADORI, S., APPELBAUM, F.R., BÜCHNER, T., DOMBRET, H., EBERT, B.L., FENAUX, P., LARSON, R.A., LEVINE, R.L., LO-COCO, F., NAOE, T., NIEDERWIESER, D., OSSENKOPPELE, G.J., SANZ, M., SIERRA, J., TALLMAN, M.S., TIEN, H., WEI, A.H., LÖWENBERG, B. and BLOOMFIELD, C.D., 2017. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, **129**(4), pp. 424-447.

*DÖHNER, H., WEISDORF, D.J. and BLOOMFIELD, C.D., 2015. Acute Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **373**(12), pp. 1136-1152.

FISCH, P., MALKOVSKY, M., BRAAKMAN, E., STURM, E., BOLHUIS, R.L., PRIEVE, A., SOSMAN, J.A., LAM, V.A. and SONDEL, P.M., 1990. Gamma/delta T cell clones and natural killer cell clones mediate distinct patterns of non-major histocompatibility complex-restricted cytotoxicity. *The Journal of Experimental Medicine*, **171**(5), pp. 1567-1579.

FOURCADE, J., SUN, Z., BENALLAOUA, M., GUILLAUME, P., LUESCHER, I.F., SANDER, C., KIRKWOOD, J.M., KUCHROO, V. and ZAROOR, H.M., 2010. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8⁺ T cell dysfunction in melanoma patients. *The Journal of Experimental Medicine*, **207**(10), pp. 2175-2186.

GENG, H., ZHANG, G., LI, D., ZHANG, H., YUAN, Y., ZHU, H., XIAO, H., HAN, L. and FENG, Z., 2006. Soluble form of T cell Ig mucin 3 is an inhibitory molecule in T cell-mediated immune response. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **176**(3), pp. 1411-1420.

GLEASON, M.K., LENVIK, T.R., MCCULLAR, V., FELICES, M., O'BRIEN, M.S., COOLEY, S.A., VERNERIS, M.R., CICHOCKI, F., HOLMAN, C.J., PANOSKALTSIS-MORTARI, A., NIKI, T., HIRASHIMA, M., BLAZAR, B.R. and MILLER, J.S., 2012. Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9. *Blood*, **119**(13), pp. 3064-3072.

GOLDEN-MASON, L., MCMAHAN, R.H., STRONG, M., REISDORPH, R., MAHAFFEY, S., PALMER, B.E., CHENG, L., KULEZA, C., HIRASHIMA, M., NIKI, T. and ROSEN, H.R., 2013. Galectin-9 functionally impairs natural killer cells in humans and mice. *Journal of Virology*, **87**(9), pp. 4835-4845.

GONÇALVES SILVA, I., GIBBS, B.F., BARDELLI, M., VARANI, L. and SUMBAYEV, V.V., 2015. Differential expression and biochemical activity of the immune receptor Tim-3 in healthy and malignant human myeloid cells. *Oncotarget*, **6**(32), pp. 33823-33833.

GONÇALVES SILVA, I., YASINSKA, I.M., SAKHNEVYCH, S.S., FIEDLER, W., WELLBROCK, J., BARDELLI, M., VARANI, L., HUSSAIN, R., SILIGARDI, G., CECCONE, G., BERGER, S.M., USHKARYOV, Y.A., GIBBS, B.F., FASLER-KAN, E. and SUMBAYEV, V.V., 2017. The Tim-3-galectin-9 Secretory Pathway is Involved in the Immune Escape of Human Acute Myeloid Leukemia Cells. *EBioMedicine*, **22**, pp. 44-57.

*GRIFFIN, J.D. and LÖWENBERG, B., 1986. Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood*, **68**(6), pp. 1185-1195.

HAUBNER, S., PERNA, F., KÖHNKE, T., SCHMIDT, C., BERMAN, S., AUGSBERGER, C., SCHNORFEIL, F.M., KRUPKA, C., LICHTENEGGER, F.S., LIU, X., KERBS, P., SCHNEIDER, S., METZELER, K.H., SPIEKERMANN, K., HIDDEMANN, W., GREIF, P.A., HEROLD, T., SADELAIN, M. and SUBKLEWE, M., 2019. Coexpression profile of leukemic stem cell markers for combinatorial targeted therapy in AML. *Leukemia*, **33**(1), pp. 64-74.

JAN, M., CHAO, M.P., CHA, A.C., ALIZADEH, A.A., GENTLES, A.J., WEISSMAN, I.L. and MAJETI, R., 2011. Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**(12), pp. 5009-5014.

KHAZNADAR, Z., HENRY, G., SETTERBLAD, N., AGAUGUE, S., RAFFOUX, E., BOISSEL, N., DOMBRET, H., TOUBERT, A. and DULPHY, N., 2014. Acute myeloid leukemia impairs natural killer cells through the formation of a deficient cytotoxic immunological synapse. *European Journal of Immunology*, **44**(10), pp. 3068-3080.

KIKUSHIGE, Y., MIYAMOTO, T., YUDA, J., JABBARZADEH-TABRIZI, S., SHIMA, T., TAKAYANAGI, S., NIRO, H., YURINO, A., MIYAWAKI, K., TAKENAKA, K., IWASAKI, H. and AKASHI, K., 2015. A TIM-3/Gal-9 Autocrine Stimulatory Loop Drives Self-Renewal of Human Myeloid Leukemia Stem Cells and Leukemic Progression. *Cell Stem Cell*, **17**(3), pp. 341-352.

KIKUSHIGE, Y., SHIMA, T., TAKAYANAGI, S., URATA, S., MIYAMOTO, T., IWASAKI, H., TAKENAKA, K., TESHIMA, T., TANAKA, T., INAGAKI, Y. and AKASHI, K., 2010. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell*, **7**(6), pp. 708-717.

LE DIEU, R., TAUSSIG, D.C., RAMSAY, A.G., MITTER, R., MIRAKI-MOUD, F., FATAH, R., LEE, A.M., LISTER, T.A. and GRIBBEN, J.G., 2009. Peripheral blood T cells in acute myeloid leukemia (AML) patients at diagnosis have abnormal phenotype and genotype and form defective immune synapses with AML blasts. *Blood*, **114**(18), pp. 3909-3916.

LI, C., CHEN, X., YU, X., ZHU, Y., MA, C., XIA, R., MA, J., GU, C., YE, L. and WU, D., 2014. Tim-3 is highly expressed in T cells in acute myeloid leukemia and associated with clinicopathological prognostic stratification. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, **7**(10), pp. 6880-6888.

*LÖWENBERG, B., DOWNING, J.R. and BURNETT, A., 1999. Acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **341**(14), pp. 1051-1062.

*MARIAT, C., SÁNCHEZ-FUEYO, A., ALEXOPOULOS, S.P., KENNY, J., STROM, T.B. and ZHENG, X.X., 2005. Regulation of T cell dependent immune responses by TIM family members. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **360**(1461), pp. 1681-1685.

*MEYERS, J.H., SABATOS, C.A., CHAKRAVARTI, S. and KUCHROO, V.K., 2005. The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases. *Trends in Molecular Medicine*, **11**(8), pp. 362-369.

MÖLLER-HACKBARTH, K., DEWITZ, C., SCHWEIGERT, O., TRAD, A., GARBERS, C., ROSE-JOHN, S. and SCHELLER, J., 2013. A disintegrin and metalloprotease (ADAM) 10 and ADAM17 are major sheddases of T cell immunoglobulin and mucin domain 3 (Tim-3). *The Journal of Biological Chemistry*, **288**(48), pp. 34529-34544.

MONNEY, L., SABATOS, C.A., GAGLIA, J.L., RYU, A., WALDNER, H., CHERNOVA, T., MANNING, S., GREENFIELD, E.A., COYLE, A.J., SOBEL, R.A., FREEMAN, G.J. and KUCHROO, V.K., 2002. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*, **415**(6871), pp. 536-541.

NAGAE, M., NISHI, N., MURATA, T., USUI, T., NAKAMURA, T., WAKATSUKI, S. and KATO, R., 2006. Crystal structure of the galectin-9 N-terminal carbohydrate recognition domain from *Mus musculus* reveals the basic mechanism of carbohydrate recognition. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**(47), pp. 35884-35893.

NDHLOVU, L.C., LOPEZ-VERGÈS, S., BARBOUR, J.D., JONES, R.B., JHA, A.R., LONG, B.R., SCHOEFLER, E.C., FUJITA, T., NIXON, D.F. and LANIER, L.L., 2012. Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity. *Blood*, **119**(16), pp. 3734-3743.

PROKHOROV, A., GIBBS, B.F., BARDELLI, M., RÜEGG, L., FASLER-KAN, E., VARANI, L. and SUMBAYEV, V.V., 2015. The immune receptor Tim-3 mediates activation of PI3 kinase/mTOR and HIF-1 pathways in human myeloid leukaemia cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **59**, pp. 11-20.

RAD, A., 2006. *This diagram shows the hematopoiesis as it occurs in humans*. Dostupné na: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hematopoiesis_\(human\)_diagram.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hematopoiesis_(human)_diagram.svg)

RANGACHARI, M., ZHU, C., SAKUIISHI, K., XIAO, S., KARMAN, J., CHEN, A., ANGIN, M., WAKEHAM, A., GREENFIELD, E.A., SOBEL, R.A., OKADA, H., MCKINNON, P.J., MAK, T.W., ADDO, M.M., ANDERSON, A.C. and KUCHROO, V.K., 2012. Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion. *Nature Medicine*, **18**(9), pp. 1394-1400.

ROTH, C.G., GARNER, K., EYCK, S.T., BOYIADZIS, M., KANE, L.P. and CRAIG, F.E., 2013. TIM3 expression by leukemic and non-leukemic myeloblasts. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, **84**(3), pp. 167-172.

SABATOS, C.A., CHAKRAVARTI, S., CHA, E., SCHUBART, A., SÁNCHEZ-FUEYO, A., ZHENG, X.X., COYLE, A.J., STROM, T.B., FREEMAN, G.J. and KUCHROO, V.K., 2003. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nature Immunology*, **4**(11), pp. 1102-1110.

*SAULTZ, J.N. and GARZON, R., 2016. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *Journal of Clinical Medicine*, **5**(3),.

SCHWITALLA, S., FINGERLE, A.A., CAMMARERI, P., NEBELSIEK, T., GÖKTUNA, S.I., ZIEGLER, P.K., CANLI, O., HEIJMANS, J., HUELS, D.J., MOREAUX, G., RUPEC, R.A., GERHARD, M., SCHMID, R., BARKER, N., CLEVERS, H., LANG, R., NEUMANN, J., KIRCHNER, T., TAKETO, M.M., VAN DEN BRINK, GIJS R., SANSOM, O.J., ARKAN, M.C. and GRETEN, F.R., 2013. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*, **152**(1-2), pp. 25-38.

SILVA, I.G., RÜEGG, L., GIBBS, B.F., BARDELLI, M., FRUEHWIRTH, A., VARANI, L., BERGER, S.M., FASLER-KAN, E. and SUMBAYEV, V.V., 2016. The immune receptor Tim-3 acts as a trafficker in a Tim-3/galectin-9 autocrine loop in human myeloid leukemia cells. *OncoImmunology*, **5**(7), pp. e1195535.

SRIKANTH, L., SUNITHA, M.M., VENKATESH, K., KUMAR, P.S., CHANDRASEKHAR, C., VENGAMMA, B. and SARMA, POTUKUCHI VENKATA GURUNADHA KRISHNA, 2015. Anaerobic Glycolysis and HIF1 α Expression in Haematopoietic Stem Cells Explains Its Quiescence Nature. *Journal of Stem Cells*, **10**(2), pp. 97-106.

TAN, J., YU, Z., HUANG, J., CHEN, Y., HUANG, S., YAO, D., XU, L., LU, Y., CHEN, S. and LI, Y., 2020. Increased PD-1+Tim-3+ exhausted T cells in bone marrow may influence the clinical outcome of patients with AML. *Biomarker Research*, **8**, pp. 6.

VAN DE WEYER, PHILIPP S., MUEHLFEIT, M., KLOSE, C., BONVENTRE, J.V., WALZ, G. and KUEHN, E.W., 2006. A highly conserved tyrosine of Tim-3 is phosphorylated upon stimulation by its ligand galectin-9. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **351**(2), pp. 571-576.

WADA, J. and KANWAR, Y.S., 1997. Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**(9), pp. 6078-6086.

WANG, F., HE, W., ZHOU, H., YUAN, J., WU, K., XU, L. and CHEN, Z.K., 2007. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates CD8⁺ alloreactive T cell and prolongs survival of skin graft. *Cellular Immunology*, **250**(1-2), pp. 68-74.

WHERRY, E.J. and KURACHI, M., 2015. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews. Immunology*, **15**(8), pp. 486-499.

WU, K., FENG, J., XIU, Y., LI, Z., LIN, Z., ZHAO, H., ZENG, H., XIA, W., YU, L. and XU, B., 2020. V δ 2 T cell subsets, defined by PD-1 and TIM-3 expression, present varied cytokine responses in acute myeloid leukemia patients. *International Immunopharmacology*, **80**, pp. 106122.

ZHOU, Q., MUNGER, M.E., VEENSTRA, R.G., WEIGEL, B.J., HIRASHIMA, M., MUNN, D.H., MURPHY, W.J., AZUMA, M., ANDERSON, A.C., KUCHROO, V.K. and BLAZAR, B.R., 2011. Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8⁺ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood*, **117**(17), pp. 4501-4510.

ZHU, C., ANDERSON, A.C., SCHUBART, A., XIONG, H., IMITOLA, J., KHOURY, S.J., ZHENG, X.X., STROM, T.B. and KUCHROO, V.K., 2005. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature Immunology*, **6**(12), pp. 1245-1252.

*review